

ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА И АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ У КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ФАЗАХ ГОДОВОГО ТРЕНИРОВОЧНОГО МАКРОЦИКЛА

УДК 616.155.1

¹Базарин К.П.: директор Интеграционного научно-технологического центра физической культуры и спорта, к.м.н.;

¹Титова Н.М.: профессор кафедры медицинской биологии, к.б.н.;

¹Кузнецов С.А.: младший научный сотрудник;

²Александрова Л.И.: доцент кафедры.

¹ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск, Россия

²ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева», г. Красноярск, Россия

CONCENTRATION CHANGES OF MALONDIALDEHYDE AND ACTIVITY GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE ERYTHROCYTES IN BLOOD OF QUALIFIED ATHLETES IN DIFFERENT PHASES OF ANNUAL TRAINING MACROCYCLE

Bazarin K.P., Titova N.M., Kuznetsov S.A., Alexandrova L.I.

Введение

Высокий уровень физических нагрузок, характерный для современного спорта, оказывает существенное влияние на генерацию активных форм кислорода (АФК), вызывая комплекс изменений в ферментных системах. Эти изменения могут носить как положительный, компенсаторный характер, так и, в ряде случаев, приводить к декомпенсации, угнетению активности антиоксидантных механизмов, накоплению в тканях АФК, с развитием повреждений.

Основные гипотезы, объясняющие повышенное образование АФК при физической нагрузке, следующие:

1. Сбой в работе дыхательной цепи митохондрий вследствие резко увеличенного потока кислорода. При физической нагрузке общий уровень потребления кислорода возрастает в 10–15 раз. Поток кислорода через ткани работающих скелетных мышц увеличивается до 100 раз, очевидно, что в этих условиях вероятность возникновения сбоев в работе дыхательной цепи также существенно повышается. «Утечка» недоокисленных продуктов возникает на этапе переноса электронов между комплексом I и III [1]. Однако, прямые экспериментальные подтверждения этой теории отсутствуют, кроме того, в условиях изометрической нагрузки, при которой PO_2 в мышечной ткани остается низким, тем не менее наблюдается повышенное образование АФК [2].
2. Ишемия/реперфузия и активация эндогенной ксантиоксидазы. Во время физической нагрузки имеет место значительное перераспределение кровотока – часть крови шунтируется и направляется к работающим мышцам. В этих условиях ряд тканей находятся в состоянии ишемии, что провоцирует конверсию ксантиндегидрогеназы в ксантиоксидазу. Когда

нагрузка заканчивается и ткани реоксигенируются, ксантиоксидаза начинает продуцировать супероксид-радикал и H_2O_2 в качестве побочных продуктов реакции деградации гипоксантина в ксантин и далее в мочевую кислоту [3].

3. Активация нейтрофилов и воспалительная реакция. Повреждение тканей при физической нагрузке вызывает активацию нейтрофилов и других фагоцитирующих клеток, которые вырабатывают АФК, необходимые для элиминации продуктов распада тканей, но также могут вызывать вторичные ее повреждения. В ряде экспериментов показана как мобилизация нейтрофилов в ответ на физическую нагрузку, так и увеличение уровня респираторного взрыва при их активации [4, 5].
4. НАД(Ф)Н-оксидаза в мышечной ткани, активированная в ходе интенсивных сокращений или вовлеченная в воспалительный ответ, может, при определенных условиях, продуцировать супероксид-радикал [6].
5. Окисление катехоламинов. Высокая физическая нагрузка сопровождается существенным повышением выделения катехоламинов – адреналина, норадреналина, дофамина [7]. В процессе их окисления могут образовываться АФК, что, в свою очередь, ведет к истощению системы антиоксидантной защиты [8].

Защита организма от АФК осуществляется антиоксидантной системой (АОС). АОС включает низкомолекулярные антиоксиданты (АО) и систему ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные превращения глутатиона и аскорбата, дисмутирующих активные формы кислорода и элиминирующих пероксиды. Степень выраженности адаптационной реакции АОС зависит от многих физиологических и внешних факторов, таких как пол, возраст, рацион питания,

получаемые медикаменты. Некоторые гены системы антиоксидантной защиты могут быть активированы достаточно быстро в ответ на патологический процесс, связанный с увеличением уровня АФК, например, при острой инфекции, интоксикации, острой гипоксии, ишемии. Другие же гены активируются гораздо медленнее и отвечают за адаптацию организма к длительно действующим факторам – таким, например, как изменившиеся условия окружающей среды, изменившиеся энергетические затраты. Следовательно, можно считать, что изменения, возникающие в системе АФК-АОС в организме спортсмена, носят сочетанный характер и не являются лишь локальным ответом на предшествующую нагрузку.

Несмотря на значительное внимание, уделяемое в последнее время свободно-радикальным механизмам повреждения, присутствие на рынке значительного количества препаратов, обладающих антиоксидантной активностью, которые в том числе активно применяются как в спортивной медицине, так и спортсменами-любителями, практически отсутствуют данные о долговременных изменениях в работе системы антиоксидантной защиты в условиях систематических спортивных физических нагрузок.

Спортивная тренировка строится на основе принципов периодизации, включая в себя циклы различной длительности. Одним из основных является годовой тренировочный макроцикл, который для большинства видов спорта включает три основных периода: подготовительный, характеризующийся высокими, но находящимися в пределах адаптационных возможностей организма спортсмена, физическими нагрузками; соревновательный – сверхвысокие нагрузки, в особенности ближе к завершению данного периода и переходный – отдых – когда нагрузки минимальны. Очевидно, что окончание каждого из обозначенных периодов является точкой, представляющей максимальный интерес для изучения долговременной динамики адаптационных процессов в организме спортсмена.

В наших предыдущих исследованиях выявлена зависимость содержания МДА и активности GST в эритроцитах венозной крови у спортсменов-ориентировщиков от предшествующего уровня физической нагрузки [9]. По этой причине, в данном исследовании мы ограничились изучением долговременных изменений концентрации МДА, как показателя интенсивности окислительных процессов и GST, как показателя активности системы антиоксидантной защиты, под влиянием систематической физической нагрузки различной интенсивности.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 87 спортсменов, представителей различных видов спорта. Женский пол – 32 человека, средний возраст составил 22.52 ± 3.1 лет; мужской пол – 55 человек, средний возраст 24.52 ± 4.02 лет. Виды спорта: спортивное ориентирование бегом, легкая атлетика (бег на средние и длинные дистанции), лыжные гонки, биатлон, регби, футбол. Квалификация: мастеров спорта международного класса 8; мастеров спорта – 37, кандидатов в мастера спорта – 31, имеющих 1-й разряд – 11. Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом, обследуемые спортсмены давали добровольное информированное согласие на участие в эксперименте.

Контрольная группа состояла из 53 человек, не испытывающих систематических высоких физических нагрузок. Мужской пол 32 человека, женский – 21. сред-

ний возраст 22.03 ± 2.11 лет. Пробы крови в контрольной группе забирались однократно.

Образцы венозной крови забирались из локтевой вены обследуемых натощак, в состоянии покоя, как минимум через 12 часов после окончания физической нагрузки. В качестве антикоагулянта использовался гепарин. Пробы были взяты в течение 3-х дней после окончания соревновательного периода (усталость); в конце переходного периода, характеризующегося значительным снижением нагрузок (отдых) и в окончании подготовительного периода, что можно считать условным пиком формы (пик).

Материалом исследования служили упакованные эритроциты, выделенные из венозной крови. Для упакованных эритроцитов определяли гемоглобин унифицированным гемиглобинцидным методом с использованием набора реактивов фирмы «Агат-Мед». Мерой окислительных процессов в исследовании служил МДА, один из продуктов перекисного окисления липидов. О содержании МДА судили по его реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой в кислой среде [10].

Мерой активности глутатион-S-трансферазы служила скорость образования глутатион-S-конъюгатов между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом в ходе катализируемой ферментом реакции. Увеличение концентрации глутатион-S-конъюгатов регистрировали на спектрофотометре «Спекол» при длине волны 340 нм [11].

Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004). Достоверность различий между несвязанными выборками определялась по U-критерию Манна-Уитни, различия между связанными выборками оценивались по W-критерию Уилкоксона.

Результаты и их обсуждение

Нами не обнаружено достоверных отличий ($p > 0,05$) в уровне МДА и активности GST между мужчинами и женщинами, как в контрольной группе, так и в группе обследуемых спортсменов. Это позволяет говорить о том, что исследуемые процессы не являются полоспецифичными. Отсутствие или слабая взаимосвязь реакций системы антиоксидантной защиты с полом показана также в ряде других исследований [12, 13]. Учитывая полученные результаты, дальнейший анализ выборки проводился без учета пола обследуемых.

В таблице 1 приводятся средние значения измеряемых показателей в контрольной группе и у обследуемых спортсменов в различных фазах годового макроцикла, а также достоверность различий между выборками.

Полученные данные представляют значительный интерес: так, уровень малонового диальдегида у спортсменов достоверно отличается от контрольной группы лишь в состоянии максимальной усталости по окончании соревновательного периода. Увеличение генерации свободных радикалов вследствие высокой физической нагрузки подтверждено рядом исследований [14–17]. В переходный и подготовительный периоды содержание МДА приходит в норму и не имеет существенных отличий от контрольной группы. Что касается активности глутатион-S-трансферазы, у спортсменов она достоверно выше, чем в контрольной группе во всех трех периодах. Уровни МДА в группе спортсменов в различных фазах годового тренировочного макроцикла достоверно отличаются между собой, аналогично – для активности GST.

Таблица. Средние значения МДА и GST, достоверность различий. Содержание МДА и активность GST в эритроцитах спортсменов в различные периоды годового тренировочного цикла.

следуемые показатели	Контроль N= 53	Усталость N= 87	Отдых N= 87	Пик формы N= 87
	1	2	3	4
МДА, мкмоль/г Hb	8,36±2,57	11,39±5,34 P _{1,2} < 0,05	8,66±2,23 P _{1,3} > 0,05 P _{2,3} < 0,05	9,45±3,35 P _{1,4} > 0,05 P _{2,4} < 0,05 P _{3,4} < 0,05
GST, ммоль/мин*г Hb	5,36±0,66	8,68±2,08 P _{1,2} < 0,05	10,64±3,01 P _{1,3} < 0,05 P _{2,3} < 0,05	9,09±3,2 P _{1,4} < 0,05 P _{2,4} < 0,05 P _{3,4} < 0,05

Таким образом, по окончании соревновательного периода уровень МДА у спортсменов значительно превышает таковой в контрольной группе, при этом, в данном периоде мы наблюдаем минимальную активность GST, что может свидетельствовать о возможной декомпенсации в системе антиоксидантной защиты. Ряд авторов отмечает, что в состоянии покоя уровень маркеров оксидативного стресса у спортсменов с синдромом перетренированности существенно выше, чем в контрольной группе, также отмечается рост уровня маркеров пропорционально интенсивности нагрузки, т.к. система антиоксидантной защиты декомпенсирована [9, 18].

Окончание подготовительного периода характеризуется средними значениями данных параметров. Интересно, что, не смотря на весьма высокие физические нагрузки в этом периоде, уровень МДА остается в пределах нормы, так как повышенное образование АФК компенсируется увеличением активности системы антиоксидантной защиты. Внутриклеточный синтез АФК является необходимым сигналом для нормального течения процессов ремоделирования в мышечной ткани, возникающих в ходе адаптации к систематическим физическим нагрузкам [19]. По всей видимости, именно умеренные, неповреждающие, концентрации АФК, возникающие при адекватной, тренирующей физической нагрузке, являются адаптивными модуляторами клеточных сигнальных путей [20]. Есть все основания полагать, что АФК используются клеткой для передачи сигнала из цитоплазмы в ядро для регуляции экспрессии генов [21]. Воздействие АФК приводит к модуляции экспрессии значительного количества генов [20] и предположительно связано с окислением цистеина в доменах связывания факторов транскрипции или сигнальных молекул. Гены, активируемые АФК, включают в себя гены первичного ответа, гены, кодирующие ферменты системы антиоксидантной защиты, гены, кодирующие белки теплового шока. Активация указанных генов возникает как при короткой, так и при длительной физической нагрузке [15]. В работающих мышцах отмечается значимое повышение активности ферментов системы антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, а также повышение концентрации белков теплового шока [21]. Одним из основных путей активации комплекса адаптивных реакций в мышечной ткани и организме в целом под воздействием АФК является активация транскрипционного фактора NF-κB и митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК). Это приводит к усилению экспрессии ряда генов, включая гены иммунного ответа, апоптоза, клеточного цикла, контролирующих рост, пролиферацию и адаптационные процессы, в частности индукцию

ферментов системы антиоксидантной защиты [22, 23]. При ингибировании аллопуринолом ксантиноксидазы, непосредственно участвующей в образовании супероксида при высокой физической нагрузке, снижается объем повреждения мышечной ткани, но также нарушается работа транскрипционного фактора NF-κB, не происходит активации экспрессии генов СОД и NO-синтаз, т.о. процессы адаптации не запускаются [24].

Во время отдыха направленность адаптационных процессов сохраняется – наблюдается достоверное увеличение активности GST по сравнению с предшествовавшим соревновательным периодом. Уровень МДА, соответственно, минимален.

Малоновый диальдегид является одним из конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Его концентрация зависит как от скорости окислительного повреждения ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидных мембранах эритроцитов, так и от интенсивности устранения ферментами – глутатионпероксидазой и глутатион-S-трансферазой. Учитывая, что GST является ферментом, который за счет восстановленного глутатиона осуществляет не только детоксикацию липоперексидов, снижая последствия окислительного стресса и эндогенной интоксикации, но также способствует выведению из организма токсичных продуктов ПОЛ и окислительной модификации белков [17], рост активности данного фермента в период восстановления организма спортсмена после периода максимальных физических нагрузок, выглядит вполне закономерным.

Заключение

Изучение влияния физических нагрузок на прооксидантную систему и систему антиоксидантной защиты является актуальной задачей по причине их значительного влияния на состояние здоровья и функциональные возможности организма. В ходе проведенного исследования выявлены долговременные достоверные изменения активности глутатион-S-трансферазы и концентрации малонового диальдегида в зависимости от предшествующего уровня физических нагрузок. Установлено достоверное увеличение уровня МДА у спортсменов по окончании соревновательного периода, по сравнению с контрольной группой на фоне минимальной активности GST, что может свидетельствовать о возможной декомпенсации в системе антиоксидантной защиты. После окончания подготовительного периода уровень МДА остается в пределах нормы, так как повышенное образование АФК компенсируется увеличением активности системы антиоксидантной защиты. Во время отдыха направленность адаптационных процессов сохраняется – мы видим достоверное увеличение актив-

ности GST по сравнению с предшествовавшим соревновательным периодом, уровень МДА минимален.

Тем не менее, важно отметить, что изолированно индикаторы уровня свободнорадикального окисления не могут являться достоверными показателями уровня утом-

ления спортсмена, так как адаптация к систематической высокой физической нагрузке является комплексным, сложным процессом, в котором задействовано значительное количество различных функциональных систем организма.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 12-04-31445.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Xu X., Arriaga E.A. Qualitative determination of superoxide release at both sides of the mitochondrial inner membrane by capillary electrophoretic analysis of the oxidation products of triphenylphosphonium hydroethidine // *Free Radical Biology and Medicine*. 2009. Vol. 46 (7). P. 905–913.
- Alessio H.M., Hagerman A.E., Fulkerson B.K., Ambrose J., Rice R.E., Wiley R.L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise // *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2000. Vol. 32 (9). P. 1576–1581.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine* // New York, NY, USA: Oxford University Press; 2007.
- Савченко, А.А., Базарин К.П. Состояние активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах у спортсменов в динамике тренировочного цикла // *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*; 2013 №6 2). – С. 151–162.
- Ramel A., Wagner K.H., Elmadfa I. Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men // *British Journal of Sports Medicine*. 2004. Vol. 38(5). P. 22.
- Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002. Vol. 397(2). P.342–344.
- Ghimire L.V., Kohli U., Li C., et al. Catecholamine pathway gene variation is associated with norepinephrine and epinephrine concentrations at rest and after exercise // *Pharmacogenet. Genomics*. 2012. Vol. 22(4). P. 254–260.
- Powers S.K., Jackson M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production // *Physiological Reviews*. 2008. Vol. 88 (4). P. 1243–1276.
- Базарин К.П., Титова Н.М., Кузнецов С.А. Динамика показателей антиоксидантного статуса у спортсменов, членов команды по спортивному ориентированию // *Вестник ВСНЦ СО РАМН*. 2013. № 5. С. 9–12.
- Ko K.M., Godin D.V. Ferric ion-induced lipid peroxidation in erythrocytes membranes effects of phytic acid and butylated hydroxytoluene. // *Mol. Cell Biochem.* – 1990 – N. 10, PP. 125–131.
- Beutler E. Red cell metabolism. // *A manual of biochemical methods*. N.Y.-London-Tokyo –1990– PP. 131–134.
- Djordjevic D., Cubrilo D., Macura M., Barudzic N., Djuric D., Jakovljevic V. The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2011 – N.351 (1–2), PP.251–259.
- Filaire E., Massart A., Portier H., Rouveix M., Rosado F., Bage A.S., Gobert M., Durand D. Effect of 6 Weeks of n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress in Judo athletes. // *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* – 2010 – N.20 (6), PP.496–506.
- Gomes E.C., Stone V., Florida-James G. Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretion after 8 km run. // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2011– N. 111 (9), PP. 2089–97.
- Ji L. L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise. // *Free Radical Biology & Medicine* – 2008– N. 44, PP. 142–152.
- Martinović J., Dopsaj V., Kotur-Stevuljević J., Dopsaj M., Vujović A., Stefanović A., Nešić G. Oxidative Stress Biomarker Monitoring in Elite Women Volleyball Athletes During a 6-Week Training Period. // *J. Strength. Cond. Res.* – 2011– N.25(5), PP.1360–7
- Tateishi N., Wang W. Glutathione: metabolism and physiological functions. // *Pharmacol. Reviews* – 2001 – N. 50 (3), PP. 335–355.
- Tanskanen M., Atalay M., Uusitalo A. Altered oxidative stress in overtrained athletes // *J. Sports Sci.* 2010. Vol. 28(3). P. 309–317.
- Ristow M., Zarse K., Oberbach A., Klötting N., Birringer M., Kiehntopf M., Stumvoll M., Kahn C.R., Bluher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. Vol. 106. P. 8665–8670.
- Jackson M.J. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 44. P. 132–141.
- Khassaf M., Child R.B., McArdle A., Brodie D.A., Esanu C., Jackson M.J. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise // *J. Appl. Physiol.* 2001. Vol. 90. P. 1031–1035.
- Upham B.L., Trosko J.E. Oxidative-dependent integration of signal transduction with intercellular gap junctional communication in the control of gene expression // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. Vol. 11. P. 297–307.
- Kramer H.F., Goodyear L.J. Exercise, MAPK, and NF- κ B signaling in skeletal muscle // *J. Appl. Physiol.* 2007. Vol. 103. P. 388–395.
- Gomez-Cabrera M.C., Domenech E., Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 44 (2). P. 126–31.

РЕЗЮМЕ

Изучались изменения концентрации малонового диальдегида (МДА) и активности глутатион-S-трансферазы (GST) в эритроцитах венозной крови у спортсменов, представителей различных видов спорта в окончании соревновательного, переходного и подготовительного периодов. Установлено достоверное увеличение уровня МДА у спортсменов, по окончании соревновательного периода по сравнению с контрольной группой на фоне минимальной активности GST, что может свидетельствовать о возможной декомпенсации в системе антиоксидантной защиты. В окончании подготовительного периода уровень МДА остается в пределах нормы, так как повышенное образование АФК компенсируется увеличением активности системы антиоксидантной защиты. В окончании переходного периода наблюдается достоверное увеличение активности GST по сравнению с предшествовавшим соревновательным периодом, уровень МДА минимален.

Ключевые слова: спорт, физическая нагрузка, система антиоксидантной защиты.

ABSTRACT

The present research is focused upon the study of the dynamics of some antioxidant status indices in sportsmen in the state of their maximum tiredness (right after competition period), after preparing period (peak of form) and after rest. The article provides with the results of the research of malondialdehyde (MDA) and glutathione-S-transferase (GST) content in venous blood erythrocytes.

We've found significant increasing of MDA level and decreasing of GST activity in athletes at the end of competitive period relatively to control group, which may indicate possible decompensation in the antioxidant system. At the end of preparative period MDA stay normal because high level of free radical production is compensated by increased antioxidant system activity. Minimum MDA level and maximum GST activity are observed at the end of rest period.

Key words: sport, physical activity, antioxidant defense system.

Контакты:

Базарин Кирилл Петрович. E-mail: kpbazarin@gmail.com